

549, 508

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. September 2004 (30.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/083415 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 5/08, 5/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002753

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. März 2004 (17.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 11 620.6 17. März 2003 (17.03.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BIOTISSUE TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE];
Engesserstrasse 4a/4b, 79108 Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ALDRIAN, Christine
[DE/DE]; Sonnhald 132, 79104 Freiburg (DE).

(74) Anwälte: TEIPEL, Susanne usw.; Schwabe, Sandmair,
Marx, Stuntzstrasse 16, 81677 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: CARTILAGINOUS CELL CULTURE MEDIUM AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: KNORPELZELL-KULTURMEDIUM UND VERWENDUNG DESSELBEN

(57) Abstract: The invention relates to a cartilaginous cell culture medium containing a base medium suitable for a primary human cell culture. The inventive medium culture comprises 0.5-50.0 ng/ml EGF, 0.5-50.0 ng/ml FGF, 0.1-10.0 ng/ml PDGF, 0.5-50.0 ng/ml IGF, 1.0-100.0 dexamethasone and 0.1-10.0 mM glutamine, possibly added with 0-15 % autogenous human serum. The use of the above defined cell culture medium for a cartilaginous cell culture (chondrocytes) is also disclosed.

(57) Zusammenfassung: Knorpelzell-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basis-
medium, welches Kulturmedium zusätzlich enthält: 0,5 - 50,0 ng/ml EGF, 0,5 - 50,0 ng/ml FGF, 0,1 - 10,0 ng/ml PDGF, 0,5 - 50,0
ng/ml IGF, 1,0 - 100,0 ng/ml Dexamethason und 0,1 - 10,0 mM Glutamin, ggf. supplementiert mit 0-15 % autologem Humanserum.
In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines wie oben definierten Knorpelzell-Kulturmediums zur Züch-
tung von Knorpelzellen (Chondrozyten).



WO 2004/083415 A1

Knorpelzell-Kulturmedium und Verwendung desselben

Die vorliegende Erfindung betrifft ein für Knorpelzellen geeignetes und vorzugsweise für Knorpelzellen selektives Kulturmedium.

Hintergrund der Erfindung

Die Knorpelzellen (Chondrozyten) sind Zellen, die für die Bildung von Knorpelgewebe vor allem in Gelenken verantwortlich sind. Verletzungen des Knorpels beispielsweise aufgrund von Unfällen oder altersbedingte und/oder verschleißbedingte Schäden des Knorpel führen meist zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Beweglichkeit und zu Schmerzen beim Betroffenen.

Defekte von Knorpelgewebe ließen dem Mediziner früher nur die Wahl, das betroffene Gelenk ruhig zu stellen. Im Rahmen der modernen Transplantationsmedizin können derartige Defekte heute häufig durch Transplantation entsprechenden Gewebematerials gelindert oder behoben werden.

Üblicherweise werden die Zellen bei einem derartigen Verfahren in eine dreidimensionale Trägerstruktur eingelagert, wobei die Form der Trägerstruktur meist der Form des späteren Implantates entspricht. Die US-Patente der Nr. 5 053 050 und 5 736 372 beschreiben Zusammensetzungen zur Reparatur von Knorpel oder Knochen, wobei Knorpel- oder Knochenzellen in eine biologisch resorbierbare Trägersubstanz eingebracht werden. Zur Stützung der Zellkultur können der Nährlösung das Zellwachstum fördernde Substanzen, Adhäsionsfaktoren usw. zugesetzt werden.

Gelenkknorpelersatz bzw. Knorpeltransplantate, bestehend aus Trägermaterial (bspw. einem resorbierbaren Vlies), biologischer Matrix (bspw. einem Gel) und autologen Zellen, insbesondere Chondrozyten, wird bzw. werden üblicherweise durch Anzucht der Chondrozyten aus dem Biopsat in 3-D-Kultur für ca. 7 Wochen in einem RPMI-Medium, Einbettung der Chondrozyten in die Matrix bspw. durch Einwalken sowie eine anschließende 2 - 5-tägige Vorkultivierung im Vlies erzeugt. Jedes für die Züchtung der Knorpelzellen verwendete Kulturmedium muss folgendes leisten:

Erstens muss es auf die Knorpelzellen proliferationsfördernd wirken. Zweitens sollte es die Dedifferenzierung der Chondrozyten hin zu einem Fibroblastoiden Typus möglichst hinauszögern. Da Dedifferenzierung und starke Poliferation meist eng zusammenhängen, muss ein geeigneter Kompromiß zwischen wachstumsfördernden und die Differenzierung stabilisierenden Eigenschaften gefunden werden. Schließlich muss ein Kulturmedium den chondrogenen Charakter der Knorpelzellen erhalten.

Kommerziell für medizinische Zwecke wird derzeit üblicherweise als Kulturmedium RPMI 1640 (enthaltend: Glucose, Aminosäuren, Vitamine, Salze und Carbonat-Puffer) ggf. supplementiert mit Humanserum, meist 10 - 15 %, verwendet. Letzteres muss vom Spender gewonnen werden, wobei die Gewinnung für diesen eine weitere Belastung darstellt. Die zu transplantierenden Zellen werden in diesem Medium üblicherweise ca. 7 Wochen bis zur gewünschten Zellzahl kultiviert. Nach dem Beimpfen auf den Transplantatträger müssen die Zellen bis zur Transplantation noch 2-5 Tage im Differenzierungsmedium kultiviert werden.

Für wissenschaftliche Zwecke verwendet man als Kulturmedium in der Regel ein mit FCS (meist 15 %) supplementiertes RPMI-Medium. Dies ist für die medizinische Verwendung ausgeschlossen.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Knorpelzell-Kulturmedium bereitzustellen, welches die oben genannten Kriterien erfüllt. Es ist weiterhin Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Knorpelzell-Kulturmedium bereitzustellen, welches eine

Verkürzung der Kulturzeiten bis zur Erzielung der gewünschten Zellzahl und/oder eine Verringerung der Zeitspanne bis zum Beimpfen des Transplantatträgers gestattet. Eine Minimierung des Gehalts an Humanserum vereinfacht die Logistik und stellt eine wesentliche Erleichterung für den Patienten dar.

Zusammenfassung der Erfindung

Die genannten Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch ein Knorpelzell- (Chondrozyten)-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, den zusätzlich folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt werden: 0,5 - 50,0 ng/ml EGF, 0,5 - 50,0 ng/ml FGF, 0,1 - 10,0 ng/ml PDGF, 0,5 - 50,0 ng/ml IGF, 1,0 - 100,0 ng/ml Dexamethason und 0,1 - 10,0 mM Glutamin. Dieses kann, falls gewünscht, mit 0 - 15 % Humanserum supplementiert werden.

In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines wie oben definierten Knorpelzell-Kulturmediums zur Züchtung von Knorpelzellen.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

Fig.1 zeigt in Form eines Balkendiagrammes die Zellzahl nach 8tägiger Kultur in verschiedenen Kulturmedien, erhalten gemäß Beispiel 1.

Fig.2 zeigt die Zeit bis zum Erhalt einer gewünschten Zellzahl am Vergleich dreier Biopsate in herkömmlichem Medium (RPMI) und einem erfindungsgemäßen Medium.

Genaue Beschreibung der Erfindung

Wie oben beschrieben, betrifft die Erfindung ein spezielles, wie in den Ansprüchen definiertes Knorpelzell-Kulturmedium. Dieses Knorpelzell-Kulturmedium enthält vorzugsweise ausschließlich nach dem Deutschen Arzneimittelgesetz (AMG) sowie nach den good medical practice- (GMP)-Richtlinien der EU zur Verwendung am Menschen zugelassene Substanzen. Die aus der Kultur gewonnenen Knorpelzellen (Chondrozyten)

können damit ohne Bedenken hinsichtlich des Kulturmediums als Transplantat verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Knorpelzell-Kulturmedium enthält ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes, vorzugsweise reichhaltiges Basismedium, das zusätzlich enthält: 0,5 - 50,0 ng/ml EGF, 0,5 - 50,0 ng/ml FGF, 0,1 - 10,0 ng/ml PDGF, 0,5 - 50,0 ng/ml IGF, 1,0 - 100,0 ng/ml Dexamethason und 0,1 - 10,0 mM Glutamin. Vorzugsweise enthält das Knorpelzell-Kulturmedium zusätzlich 5,0 - 20,0 ng/ml EGF, 5,0 - 20,0 ng/ml FGF, 1,0 - 6,0 ng/ml PDGF, 5,0 - 20,0 ng/ml IGF, 10,0 - 60,0 ng/ml Dexamethason und 1,0 - 6,0 mM Glutamin, noch stärker bevorzugt 10,0 ng/ml EGF, 10,0 ng/ml FGF, 3,0 ng/ml PDGF, 10,0 ng/ml IGF, 40,0 ng/ml Dexamethason und 4,0 mM Glutamin.

Erfindungsgemäß kann grundsätzlich jedes bekannte und für die Kultivierung von primären human Zellen geeignete Basismedium verwendet werden. Bevorzugt handelt es sich um ein relativ reichhaltiges Medium (kein Mangelmedium). Das Basismedium kann jede geeignete Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquelle verwenden. Vorzugsweise werden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen verwendet, die den Vorgaben des AMG und der GMP-Richtlinie entsprechen. Die Konzentrationen sind hier variabel und können vom Fachmann anhand von Routineversuchen bestimmt und optimiert werden. Das Medium weist weiterhin vorzugsweise einen Ca^{2+} -Gehalt von nicht über 2,5 mM, vorzugsweise nicht über 1,8 mM auf. Bevorzugt liegt der Gehalt an Ca^{2+} außerdem nicht unter 0,4 mM, stärker bevorzugt nicht unter 0,6 mM.

Geeignete und für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bevorzugte Medien sind ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Eagle's MEM, DMEM, MEM, RPMI und OptiPro. Ein besonders bevorzugtes Medium ist das Basalmedium OptiPro®, das von der Firma Invitrogen, vertrieben wird.

Der erste Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums ist ein EGF (Epidermal Growth Factor), in einer Menge von 0,5 bis 50,0 ng/ml, vorzugsweise 5,0 bis 20,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 10,0 ng/ml. Der EGF ist ein genereller Wachstumsfaktor für mesenchymale Zellen. Bevorzugt handelt es sich um rekombinantes, noch stärker bevorzugt rekombinantes human EGF (rh EGF).

Der zweite Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums ist ein FGF, vorzugsweise der basic FGF (Fibroblast Growth Factor), in einer Menge von 0,5 bis 50,0 ng/ml, vorzugsweise 5,0 bis 20,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 10,0 ng/ml. Der bFGF ist in vivo ein genereller Wachstumsfaktor für mesodermale und neuro-ectodermale Zellen. In vitro schränkt der bFGF die Ansprüche an die Serumqualität ein. Bevorzugt handelt es sich um einen rekombinanten, noch starker bevorzugt einen rekombinanten, humanen bFGF.

Der dritte Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums ist der PDGF (Platelet Derived Growth Factor) in einer Menge von 0,1 bis 10,0 ng/ml, vorzugsweise 1,0 bis 6,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 3,0 ng/ml. Unter den Oberbegriff PDGF fällt ein ganzes Spektrum an verwandten Molekülen, denen verschiedene Aufgaben zukommen. U.a. fungieren die PDGF als Wachstumsfaktoren, bei der Wundheilung und als Chemotaxisfaktoren. Bevorzugt verwendet man einen rekombinanten human PDGF (rh PDGF). Stärker bevorzugt handelt es sich um BB-Homodimere.

Der vierte Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums ist ein IGF, vorzugsweise IGF-1 (Insulinlike Growth Factor), in einer Menge von 0,5 bis 50,0 ng/ml, vorzugsweise 5,0 bis 20,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 10,0 ng/ml. Der Ausdruck IGF bezeichnet als Oberbegriff insbesondere den IGF-1 und den IGF-2. Die IGF stellen starke Wachstumsfaktoren u.a. für Knorpelzellen dar. Sie wirken zum Teil synergistisch mit anderen Wachstumsfaktoren. Bevorzugt verwendet man einen rekombinanten, stärker bevorzugt rekombinanten human IGF (rh IGF).

Bei dem fünften Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums handelt es sich um Dexamethason in einer Menge von 1,0 bis 100,0 ng/ml, vorzugsweise 10,0 bis 60,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 40,0 ng/ml. Dexamethason (9a-Fluor-16a-methylprednisolon) ist ein halbsynthetisches Glucocorticoid, welches die ACTH-Sekretion beeinflusst. Dexamethason ist ein Differenzierungsfaktor für Knorpelzellen.

Bei dem sechsten Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums handelt es sich um Glutamin in einer Menge von 0,1 bis 10,0 mM, vorzugsweise 1,0 bis 6,0 mM, am meisten bevorzugt etwa 4,0 mM. Glutamin ist eine der natürlich vorkommenden Aminosäuren, die üblicherweise als Stickstoffquelle dienen kann.

Weiterhin kann, das erfindungsgemäße Medium mit Humanserum (HS), vorzugsweise autologisch, in einer Menge von 0-15 %, vorzugsweise 0-10 %, am meisten bevorzugt 3-5 % (Gew/Vol) supplementiert sein, muss aber nicht. Das zeigt, dass das erfindungsgemäße Kulturmedium eine vorteilhafte Verringerung dieses Zusatzes ermöglicht, der nach dem Stand der Technik bislang in höheren Mengen erforderlich war.

In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des oben beschriebenen Knorpelzell-Kulturmediums zur Züchtung von Knorpelzellen, insbesondere zu deren selektiver Züchtung. Die Kulturbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können anhand von Routineexperimenten optimiert werden.

Die Züchtung der Knorpelzellen unter Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums erfolgt ausgehend von Gewebebiopsien eines Spenders und vorzugsweise des zu behandelnden Patienten selbst. Vorzugsweise sind die erhaltenen Knorpelzellen zur Reimplantation in den Menschen, insbesondere den Spender bestimmt. Sind Spender und Empfänger identisch, ist eine Transplantatabstoßung nicht zu befürchten, sofern nicht das Kulturmedium antigene Substanzen enthält. Letzteres entspricht nicht dem AMG und ist daher nicht erwünscht.

Ein überraschender und nicht zu erwartender Vorteil des erfindungsgemäßen Mediums mit der erfindungsgemäßen Zusatzkombination sind die hohen Vermehrungsraten der Knorpelzellen, im Beispiel mit nur 3 % humanem autologen Serum. In entsprechenden Vergleichsversuchen mit dem kommerziell verwendeten Medium RPMI, supplementiert mit Humanserum (10 % und 15 %), hat die Anmelderin gefunden, dass das erfindungsgemäße Knorpelzell-Kulturmedium hinsichtlich der Wachstumsraten verbesserte Ergebnisse liefert. Konkret lässt sich die Zeit bis zum Beimpfen des Transplantatträgers und anschließend bis zur Transplantation mit Hilfe des erfindungsgemäßen Kulturmediums deutlich senken. Durch kürzere Kultivierung und optimierte Faktoren sind die Zellen weniger dedifferenziert. Das chondrogene Potential und damit die Produktqualität ist somit erhöht. Gemäß der bevorzugten Ausführungsform kann beispielsweise diese Zeit um das 3,5-fache verkürzt werden.

Beispiele

Beispiel 1

In einem ersten Beispiel wurden je 0,1 Mio. Zellen eines Biopsats, d.h. identischen Ursprungs, in fünf verschiedenen Medien kultiviert und die Zellzahl nach 8 Tagen in Kultur bestimmt. Die Kultur erfolgte bei 37°C in Zellkulturflaschen. Verwendet wurde als Vergleich RPMI, supplementiert mit 15 % Humanserum (HS) als das bisherige Knorpelmedium sowie das Medium OptiPro der Fa. Invitrogen und Wachstumszusätze, supplementiert mit 3 % HS:

Tabelle 1: Verwendete Wachstumszusätze (BTT Faktormix)

Zusatz	Menge
EGF:	10 ng/ml
FGF:	10 ng/ml
PDGF:	3 ng/ml
IGF:	10 ng/ml
Dexamethason:	40 ng/ml
Glutamin	4 mM

Tabelle 2: Verwendete Medien

Basismedium	Humanserum (%)	BTT Faktormix
RPMI	3	+
RPMI (Vergl.)	15	-
OptiPro®	3	+
OptiPro®	-	+
OptiPro® (Vergl.)	3	-

Zum direkten Vergleich wurden parallele Zellkulturen aus Biopsaten derselben Testpersonen mit den in Tabelle 2 genannten Medien etabliert und nach gängigen Verfahren geführt. Im Ergebnis entspricht das Wachstum und die Morphologie von etablierten Knorpelzell-Kulturen mit dem erfindungsgemäßen Medium etwa denjenigen des supplementierten RPMI-Mediums.

Allerdings bietet das erfindungsgemäße Medium Vorteile bei der Etablierung der Kultur, dahingehend, dass die Zellausbeute bei geringerer Supplementierung mit HS durchschnittlich 2,5 bis 10-mal höher liegt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt.

Gleichzeitig lässt sich dadurch die Kulturdauer und Zahl der erforderlichen Passagierungen bis zum Erhalt der zum Beimpfen des Transplantats erforderlichen Zellzahl senken. Insgesamt kann damit die Transplantation früher und mit besserer Zellqualität erfolgen.

Beispiel 2:

In einem zweiten Versuch wurden Biopsate dreier Spender jeweils in erfindungsgemäßem Medium (Nr.3 oben; OptiPro® mit 3% HS und Zusätzen) bzw. RPMI (10% HS) kultiviert und die Dauer bis zum Erhalt der erforderlichen Zellzahl in der Kultur, ausgehend von identischen Okulaten, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 gezeigt.

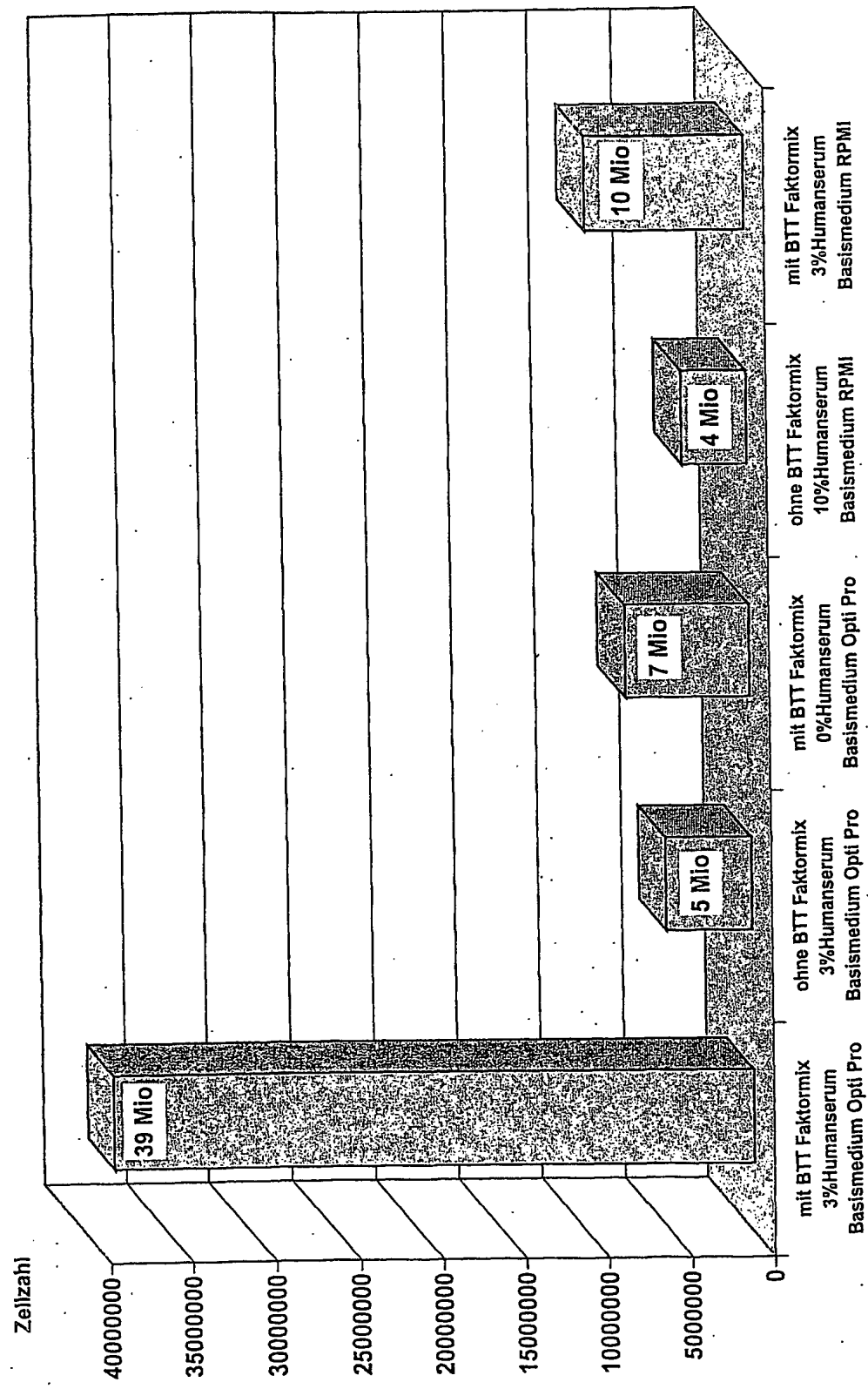
Aus Fig. 2 ist ersichtlich, dass sich durch Kultivieren im erfindungsgemäßen Medium die Zeit bis zum Erhalt einer Zellzahl von 60 Mio. Zellen in Abhängigkeit vom Alter des Spenders deutlich (ca. um das 3-fache) verkürzen lässt.

Patentansprüche

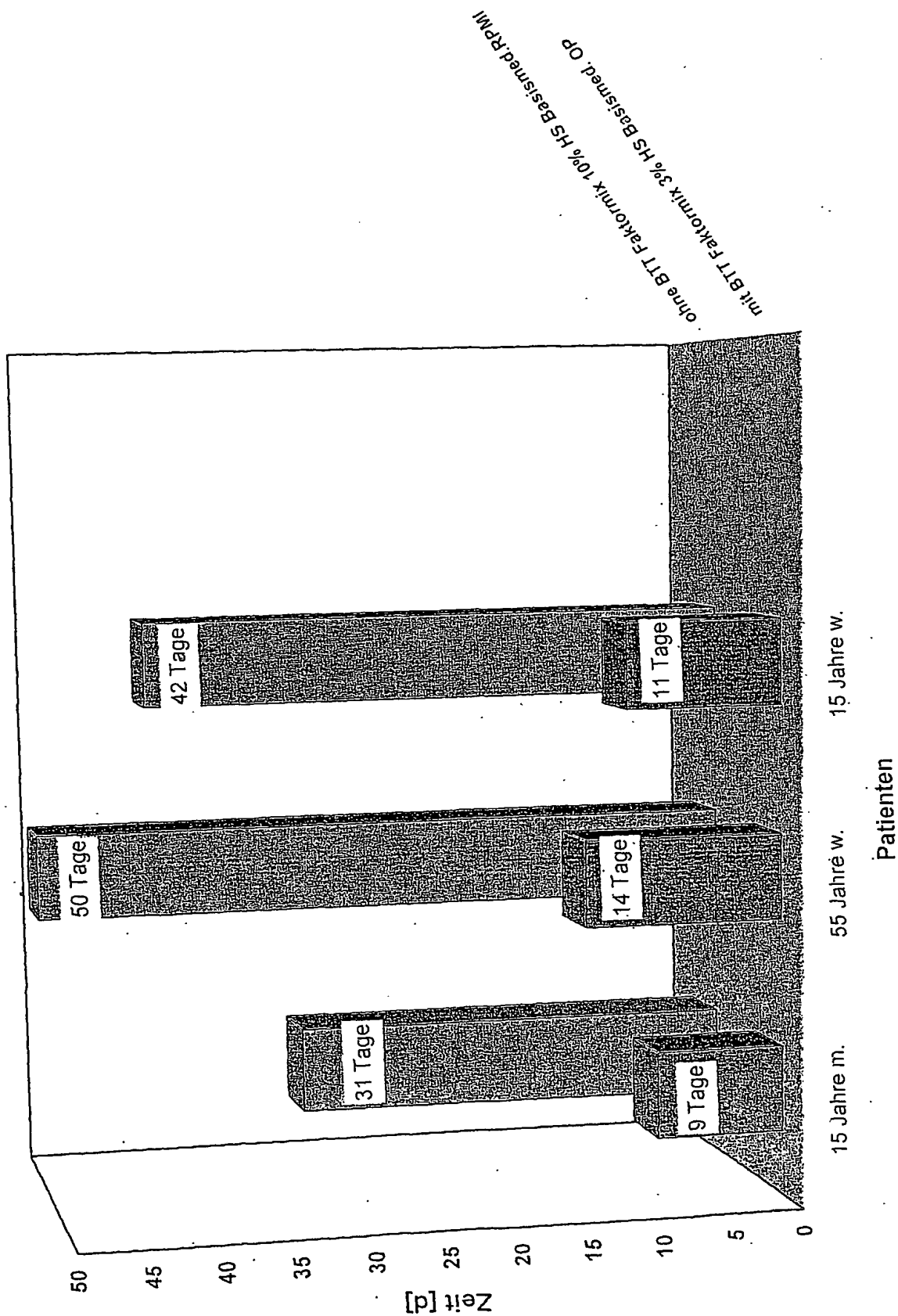
1. Knorpelzell-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium und zusätzlich: 0,5 - 50,0 ng/ml EGF, 0,5 - 50,0 ng/ml FGF, 0,1 - 10,0 ng/ml PDGF, 0,5 - 50,0 ng/ml IGF, 1,0 - 100,0 ng/ml Dexamethason und 0,1 - 10,0 mM Glutamin.
2. Knorpelzell-Kulturmedium nach Anspruch 1, enthaltend: 5,0 - 20,0 ng/ml EGF, 5,0 - 20,0 ng/ml FGF, 1,0 - 6,0 ng/ml PDGF, 5,0 - 20,0 ng/ml IGF, 10,0 - 60,0 ng/ml Dexamethason und 1,0 - 6,0 mM Glutamin.
3. Knorpelzell-Kulturmedium nach Anspruch 1, enthaltend: 10,0 ng/ml EGF, 10,0 ng/ml FGF, 3,0 ng/ml PDGF, 10,0 ng/ml IGF, 40,0 ng/ml Dexamethason und 4,0 mM Glutamin.
4. Knorpelzell-Kulturmedium nach einem der vorstehenden Ansprüche, zusätzlich enthaltend bis zu 15 % (w/v) Humanserum.
5. Knorpelzell-Kulturmedium nach Anspruch 4, zusätzlich enthaltend 3 bis 5 % (w/v) Humanserum.
6. Knorpelzell-Kulturmedium nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem das Basismedium ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Eagle's MEM, DMEM, RPMI, MEM und OptiPro®.
7. Verwendung eines Knorpelzell-Kulturmediums gemäß einem der vorstehenden Ansprüche zur Züchtung von Knorpelzellen.

8. Verwendung nach Anspruch 7, worin die Züchtung ausgehend von Gewebebiopsien eines Patienten erfolgt.
9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, worin die Knorpelzellen zur Reimplantation in den Menschen bestimmt sind.
10. Knorpelzellsuspension in einem Medium gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

Figur 1



Figur 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/002753

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/08 C12N5/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/27996 A (ISTITUTO NAZIONALE PER LA RICERCA SUL CANCRO) 18 May 2000 (2000-05-18) -----	
A	WO 98/59035 A (US HEALTH (US)) 30 December 1998 (1998-12-30) -----	
A	US 6 150 163 A (GENZYME CORP) 21 November 2000 (2000-11-21) -----	
A	"OptiPro(TM) SFM" 'Online! June 2001 (2001-06), , XP002293964 Retrieved from the Internet: URL: http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3943.pdf -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 2004

Date of mailing of the international search report

08/09/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/002753

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0027996	A	18-05-2000	AU 758073 B2	13-03-2003
			AU 1380400 A	29-05-2000
			CA 2348687 A1	18-05-2000
			WO 0027996 A1	18-05-2000
			EP 1131407 A1	12-09-2001
			JP 2002529071 T	10-09-2002
			US 6617159 B1	09-09-2003
<hr/>				
WO 9859035	A	30-12-1998	AU 7984498 A	04-01-1999
			WO 9859035 A2	30-12-1998
			US 2001039050 A1	08-11-2001
<hr/>				
US 6150163	A	21-11-2000	AU 730749 B2	15-03-2001
			AU 3740197 A	20-02-1998
			CA 2261292 A1	05-02-1998
			EP 0920490 A2	09-06-1999
			JP 2000515023 T	14-11-2000
			WO 9804681 A2	05-02-1998
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002753

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N5/08 C12N5/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 00/27996 A (ISTITUTO NAZIONALE PER LA RICERCA SUL CANCRO) 18. Mai 2000 (2000-05-18) -----	
A	WO 98/59035 A (US HEALTH (US)) 30. Dezember 1998 (1998-12-30) -----	
A	US 6 150 163 A (GENZYME CORP) 21. November 2000 (2000-11-21) -----	
A	"OptiPro(TM) SFM" 'Online! Juni 2001 (2001-06), , XP002293964 Gefunden im Internet: URL: http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3943.pdf -----	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* & * Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. August 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/09/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Teyssier, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002753

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0027996 A	18-05-2000	AU 758073 B2	13-03-2003
		AU 1380400 A	29-05-2000
		CA 2348687 A1	18-05-2000
		WO 0027996 A1	18-05-2000
		EP 1131407 A1	12-09-2001
		JP 2002529071 T	10-09-2002
		US 6617159 B1	09-09-2003
WO 9859035 A	30-12-1998	AU 7984498 A	04-01-1999
		WO 9859035 A2	30-12-1998
		US 2001039050 A1	08-11-2001
US 6150163 A	21-11-2000	AU 730749 B2	15-03-2001
		AU 3740197 A	20-02-1998
		CA 2261292 A1	05-02-1998
		EP 0920490 A2	09-06-1999
		JP 2000515023 T	14-11-2000
		WO 9804681 A2	05-02-1998